

**SUR LES CARACTÈRES CYTOLOGIQUES ET LA SYSTÉMATIQUE
DES AMIBES DU GROUPE *LIMAX* (*Nægleria* nov. gen. et
Hartmannia nov. gen.) ET DES AMIBES PARASITES DES
VERTÉBRÉS (*Proctamæba* nov. gen.)**

PAR

A. ALEXEIEFF

I. — SUR LA SPÉCIFICATION DES AMIBES DU GROUPE *limax*.

Tous les protistologues s'accordent actuellement à reconnaître que sous le nom d'*Amæba limax* Dujardin un nombre considérable de formes spécifiquement distinctes ont été confondues. Cependant les bases rationnelles de la spécification dans ce groupe n'ayant pas été établies, la plupart des Amibes décrites ces dernières années sont insuffisamment caractérisées et ne sauraient être reconnues que par les auteurs qui ont créé ces espèces, et encore à condition d'examiner leurs propres préparations, la question de technique jouant ici un rôle important comme nous le verrons (1). Ainsi on a cru que l'étude de la *division nucléaire* chez les Amibes *limax* donnait de bons caractères différentiels. En réalité le processus mitotique (*promitose* NÄGLER, 1909) y est en général très uniforme et ne présente que quelques rares variantes, d'importance tout à fait secondaire, et dont la plupart peuvent se rencontrer chez une même espèce et par conséquent ne sauraient pas être considérées comme des différences d'ordre spécifique. L'*habitat* des Amibes *limax* n'a rien à voir avec leur spécification (2) ; ce sont les Protozoaires *cosmopolites* par excellence et qui, de plus, sont très peu exi-

(1) WÜLKER (1911) donne à la fin de son mémoire un tableau très complet des Amibes qui ont été décrites avec plus ou moins de précision par les divers auteurs (il s'agit surtout des Amibes que l'on peut cultiver). Ce tableau sera consulté avec profit toutes les fois que l'on trouvera une Amibe dans les infusions végétales (ou autres) ou dans les excréments d'animaux; il renferme résumés les principaux caractères des Amibes trouvées dans les divers milieux; il s'en faut cependant que toutes ces Amibes soient si bien caractérisées que l'on puisse les reconnaître à coup sûr.

(2) Je ne veux point dire par là qu'une espèce donnée d'Amibe ne se trouve de préférence dans un milieu « biologique » déterminé; au contraire, j'ai déjà fait remarquer (1911) que dans une infusion de foin c'est toujours *Amæba limax* Duj. étudiée par VAHLKAMPF (1905) (espèce type) qui apparaît et se développe avec une telle exubérance que l'étude de cette Amibe peut être faite très facilement : les

geants : les *Amibes limax* peuvent vivre partout où il y a des Bactéries. Ces Amibes ne sont jamais des parasites; on a quelquefois pris ces saprozoïtes pour des parasites nécessaires, mais tous ces cas demandent une vérification sérieuse; leurs kystes peuvent traverser le tube digestif de divers animaux, mais les Amibes ne sortiront de leur enveloppe kystique que dans les excréments rejetés (1).

La structure d'une Amibe *limax* à l'état végétatif se réduit à fort peu de choses : 1° *cytoplasme* progressant à l'aide d'un gros pseudopode lobé, généralement unique, et renfermant des inclusions englobées dans le milieu ambiant; 2° *noyau* présentant un caryosome volumineux et une plus ou moins grande quantité de chromatine périphérique située près de la membrane nucléaire plus ou moins nette. Il est évident qu'une structure aussi simple ne donne pas beaucoup de prise pour la spécification. Il faut avoir recours à l'étude de l'évolution : *division* et *enkystement*. En effet, la mitose, malgré qu'elle soit en général très uniforme, pourra dans quelques rares cas donner des indications; d'autre part, la paroi du kyste présente assez souvent des ornements qui constituent de très bons caractères différentiels. Divers processus sexuels qui se passeraient à l'intérieur du kyste (*autogamie* ou *hétérogamie*) donneraient de bons caractères; malheureusement il y a lieu de faire de grandes réserves à ce sujet; en effet, l'interprétation de l'autogamie comme processus sexué peut être discutée, et, d'autre part, il serait prématuré de généraliser l'hétérogamie dont on ne connaît qu'un cas, chez *A. diploidea* Hartmann, étudié par HARTMANN et NÄGLER (2).

stades de division sont très nombreux, quelquefois on observe le stade flagellé, finalement les Amibes s'enkystent. Cependant, si l'on ensemence une infusion de foin fraîche avec les kystes d'*A. punctata* Dangeard, cette Amibe s'y développe très bien et peut même supplanter l'*A. limax* Duj. Je voudrais donc mettre en garde contre une opinion qu'il y a une relation étroite entre une espèce amibienne et le milieu naturel où on l'a signalée pour la première fois. Ainsi, pour prendre un exemple concret, WASIELEWSKI et HIRSCHFELD (1910) ont isolé du tan une Amibe qui n'est certainement pas *A. Froschi* Hartmann décrite par NÄGLER (1909) dans le tan aussi, et il est bien probable qu'on trouvera dans les macérations de tan encore d'autres espèces d'Amibes. Il faut cependant, dans tous ces cas, ne pas confondre les Amibes qui proviennent des kystes se trouvant dans le substratum, dont on part pour faire une macération, avec les Amibes extrêmement répandues, comme *A. limax* Duj. par exemple, dont les kystes doivent se trouver partout (en particulier dans la poussière des laboratoires); ces dernières peuvent contaminer pour ainsi dire les infusions.

(1) Je ne parle pas du cas bien connu de *Chlamydomorphys stercorea*, qui est un Thécambien; on sait que d'après SCHAUDINN *Leydenia gemmipara* représenterait le *C. stercorea* dépourvu de coque.

(2) Je n'ai observé chez cette Amibe que l'enkystement *solitaire*.

Considérons donc l'un après l'autre les divers caractères qui doivent servir à la spécification des Amibes *limax*.

1° *Structure du noyau à l'état végétatif.* — a) Le rapport du diamètre du caryosome à celui de la vésicule nucléaire varie de $1/2$ à $3/4$ suivant les espèces et se présente avec un caractère de grande constance à condition qu'on le considère à des phases de développement comparables (1). Ce caractère doit être manié très prudemment : il ne sera pris en considération que dans les cas extrêmes, c'est-à-dire quand le caryosome se présente relativement très grand ou au contraire très petit. De plus, ce caractère doit être accompagné par d'autres caractères différentiels.

b) La quantité et la disposition de la chromatine périphérique. Ce caractère doit être observé dans le noyau à l'état de « repos », chez l'Amibe qui ne vient pas de sortir d'une division ni ne se prépare à une division ; en effet, la quantité de la chromatine périphérique est très augmentée lorsqu'il s'agit du prélude de la division ou du noyau-fils qui résulte d'une division récente. Une remarque de technique importante s'impose au sujet de la chromatine périphérique : si l'on se sert de l'hématoxyline au fer, une coloration complémentaire plasmatique (à l'éosine tout particulièrement) est de rigueur. En effet, les granulations de la chromatine périphérique se trouvent débarrassées de la laque ferrique par l'alun de fer bien avant le volumineux caryosome. D'où toute une série d'affirmations erronées que le noyau de certaines Amibes *limax* ne présente pas du tout de chromatine périphérique. En réalité il n'y a pas une seule Amibe *limax* dont le noyau soit entièrement dépourvu de chromatine périphérique.

2° *Ornementation de la paroi kystique.* — Les punctuations d'*A. punctata* Dangeard sont d'une grande précision et fournissent un caractère spécifique d'une importance capitale.

3° *Mitose.* — On a distingué plusieurs « modes » de la division nucléaire chez les Amibes *limax*. En réalité ce ne sont que les différentes manières d'être des deux plaques équatoriales filles qui, dans leur ascension vers les deux pôles du noyau en division, acquièrent la sidérophilie (leur chromatine se mélangeant à de la plastine) plus ou moins vite *dans une même espèce*. Au fond, la promitose des Amibes *limax* est très uniforme. Si l'on peut tout de même y déceler des différences, celles-ci ne seront

(1) Pendant l'état enkysté, le caryosome est généralement plus petit que dans l'Amibe au stade mobile; ce sont là les *variations cycliques* du caryosome bien mises en évidence par HARTMANN.

point fournies par les plaques équatoriales filles ; c'est le mode de la constitution de la plaque équatoriale qui n'est pas exactement le même dans les diverses Amibes. Dans la majorité des cas la plaque équatoriale est constituée exclusivement par la

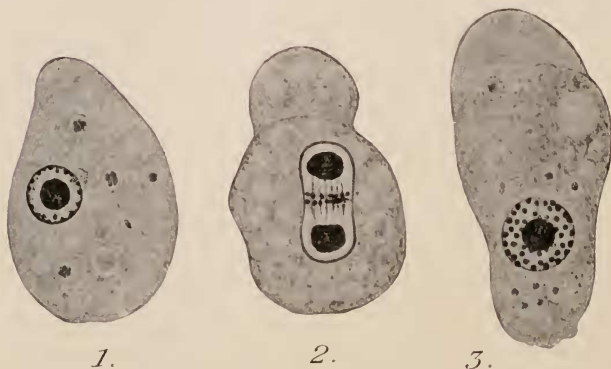


FIG. 1. — 1 et 2, *Nægléria punctata* (Dangeard) $\times 1500$. — 1, individu à l'état végétatif montrant le *protocaryon* (noyau avec un volumineux caryosome et petite quantité de chromatine périphérique sous la forme de grains peu sidérophiles); 2, stade de la plaque équatoriale (celle-ci est formée par la chromatine périphérique), deux corps polaires volumineux et sidérophiles qui sont caractéristiques de la *promitose*; 3, *Nægléria limax* (Dujardin, *emend.* Vahlkampff) $\times 1500$. Prélude de la division nucléaire : enrichissement de la chromatine périphérique par les grains se détachant du caryosome.

chromatine périphérique ; cependant, dans certains cas, ainsi que je l'ai montré (1911) pour *A. limax* Duj. *emend.* Vahlkampff (1), une certaine quantité de la chromatine caryosomienne vient enrichir la plaque équatoriale dont la principale partie est cependant ici aussi constituée par la chromatine périphérique (2).

(1) Pour CHATTON (1910), le terme *Amoeba limax* Duj. devrait devenir *nomen nudum*, et cet auteur donne à l'*A. limax* le nom d'« *A. Vahlkampff* ». Agir ainsi est tout à fait contraire aux règles de la nomenclature, d'après lesquelles, toutes les fois qu'on démembre une espèce, on doit garder le nom ancien pour l'espèce-type qui, dans ce cas particulier, est représentée par la forme étudiée la première d'une façon précise, c'est dire *A. limax* Duj. étudiée par VAHLKAMPFF en 1905.

(2) Dans certains cas, le stade de la plaque équatoriale pourrait être omis et alors la chromatine périphérique est répartie directement aux deux pôles du caryosome allongé; cette division rappelle un peu l'*haptomitose* simplifiée (*cryptohaptomitose*); ce mode de division nucléaire coexiste avec la *promitose* typique.

En résumé, voici par quels caractères on se guidera pour donner des diagnoses précises des Amibes *limax* : *rapport caryo-caryosomien* ; *parois du kyste* (mamelonnées, ponctuées, etc.) ; *division nucléaire*.

II. — SUR LA SYSTÉMATIQUE DES AMIBES LIBRES

Il est indiscutable que le genre *Amœba* Ehrenberg est trop vaste. Quand on n'avait que des notions très vagues sur l'évolution et les détails cytologiques de la structure des divers représentants du genre *Amœba*, il était prématuré d'entreprendre de scinder ce genre. Cependant aujourd'hui, grâce à de nombreuses recherches effectuées ces dernières années, nos connaissances sur les Amœbiens se trouvent considérablement enrichies; les Amibes du groupe *limax* ont été particulièrement bien étudiées et l'on a vu qu'il était tout à fait artificiel de réunir ces Amibes (qui forment un groupe très homogène quoique présentant des affinités multiples) aux Amibes de grande taille telles que *A. proteus*, *A. vespertilio*, etc. Comme l'espèce type du genre *Amœba* est l'*A. verrucosa* Ehrbg., on devra garder ce nom générique pour les Amibes de grande taille, tandis qu'un nouveau terme générique sera appliqué aux Amibes du groupe *limax*; je propose le nom *Nægleria* dédié à l'auteur à qui nous devons des recherches importantes sur les Amibes *limax*.

Le genre *Nægleria nov. gen.* sera caractérisé ainsi : Amibes de petite taille, se déplaçant *généralement* à l'aide d'un large pseudopode lobé; quelquefois cependant plusieurs pseudopodes peuvent se former simultanément. Vacuole pulsatile. Un seul noyau (1), à caryosome volumineux, dense et chromophile, pauvre en chromatine périphérique (*protocaryon*). Division nucléaire caractérisée par les *corps polaires* volumineux, dérivés du caryosome, la plaque équatoriale formée principalement aux dépens de la chromatine périphérique. Kystes uninucléés, avec des corpuscules chromatoïdes, qui disparaissent dans les kystes âgés. Stade flagellé (2), à deux flagelles. Espèce type : *Nægleria limax* (Duj., *emend.* Vahlkampf).

(1) Il y a avantage à garder, au moins provisoirement, le nom générique de *Sappinia* Dangeard pour les formes binucléées (*S. pedata* Dangeard, *S. [Amœba] diploïdea* Hartmann et Nägler).

(2) WASIELEWSKI et HIRSCHFELD (1910) ont étudié une Amibe isolée de l'infusion du foin et une autre isolée de la macération du tan : ils ont reconnu l'existence du stade flagellé chez les deux. J'ai observé (1912) le stade flagellé chez deux Amibes des plus répandues : *N. limax* (Duj., *emend.* Vahlkampf) et *N. punctata* (Dangeard). Il est donc très probable que nombre de *Nægleria*, et peut-être même

La coupure générique séparant les grosses Amibes du type *A. verrucosa* et les Amibes du groupe *limax* est extrêmement nette; cela ne veut pas cependant dire qu'il n'y ait pas de formes de transition entre les deux genres *Amœba* et *Nægleria*.

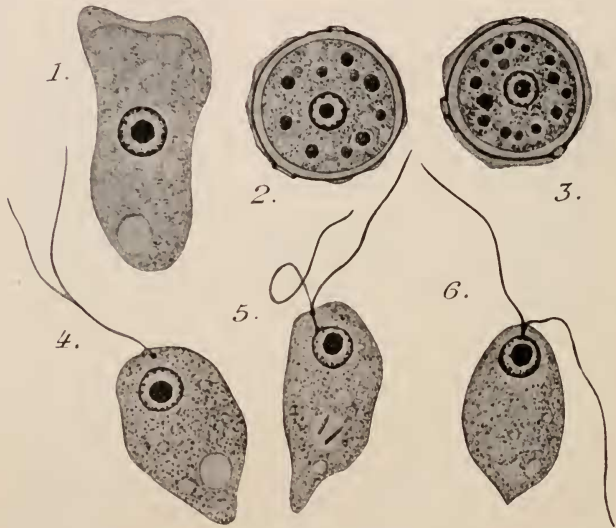


FIG. II. — 1 à 6, *Nægleria punctata* (Dangeard) $\times 1500$. — 1, Amibe à l'état végétatif montrant son protocaryon et une vacuole pulsatile; 2 et 3, kystes avec leurs ponctuations caractéristiques; on voit des corps chromatiques (*trophochromidies*) volumineux dans le cytoplasme; 2, le caryosome est plus petit que dans les Amibes non enkystées (*variations cycliques*); 4 à 6, *N. punctata* pendant le stade flagellé montrant : deux flagelles, grains basaux, rhizoplate (inconstant), noyau (très antérieur), une vacuole pulsatile placée près de l'extrémité postérieure (en 4, elle est en pleine diastole; en 5 et 6 : phases de la reconstitution de la vacuole après une systole).

DOFLEIN (1911) a reproduit dans son traité quelques figures inédites du D^r GLAESER se rapportant à la division nucléaire d'*A. verrucosa*; on voit là une mitose un peu plus complexe que

toutes, présentent ce stade flagellé, et comme on peut le faire apparaître facilement à volonté (voir à ce sujet les données très intéressantes qui se trouvent dans le mémoire de WASIELEWSKI et HIRSCHFELD, 1910), cela pourra avoir une application pour décider dans les cas difficiles s'il s'agit d'une Amibe parasite ou d'une *Nægleria* libre. En effet, on a fait maintes fois la confusion entre les Amibes pathogènes et les Amibes *limax* (ou *Nægleria*) : en voulant cultiver celles-là, on

la promitose des *Nægléria*, mais qui a encore les caractères essentiels d'une promitose (corps polaires volumineux et massifs, plaque équatoriale formée probablement par la chromatine périphérique); le noyau d'*A. verrucosa* se distingue cependant de celui des *Nægléria* par la présence d'un *nucléole* peu chromatique coexistant avec le caryosome qui prend très fortement les colorants. Dans le noyau de l'Amibe du tan, WASIELEWSKI et HIRSCHFELD (1910) ont mis en évidence la présence constante d'un corpuscule chromatique placé à côté du caryosome; ce corpuscule n'est probablement pas tout à fait analogue au nucléole d'*A. verrucosa*: leurs propriétés tinctoriales paraissent très différentes; cependant il est intéressant de constater que la même complication dans la structure nucléaire peut exister dans une *Amæba* et dans une *Nægléria* (1).

Cependant toutes les Amibes *limax* ne peuvent rentrer dans le genre *Nægléria* défini ci-dessus. Ainsi, la division nucléaire est complètement différente de la promitose chez *Amæba Gleicheni* Duj., chez *A. hyalina* Dangeard et chez quelques autres Amibes du groupe *limax*; au lieu des corps polaires volumineux si caractéristiques de la promitose, il n'y aurait aux pôles que

cultive en réalité celles-ci. Le stade flagellé pourra servir de criterium pour trancher la question (sans parler de caractères cytologiques en somme très différents dans les *Nægléria* et dans les Amibes parasites): si l'on obtient dans certaines conditions particulières le stade flagellé pour une Amibe donnée, ce n'est certainement pas là l'état cultural d'une Entamibe (Amibe parasite), mais il doit s'agir d'une *Nægléria*. Les kystes des Amibes *limax* se trouvent en effet souvent dans le contenu intestinal et on les ensemence sans le vouloir en même temps que les Amibes pathogènes; ou bien la culture est contaminée secondairement par les innombrables kystes d'Amibes qui se trouvent dans l'atmosphère; dans les deux cas, le résultat est le même: on étudie l'évolution d'une *Nægléria* et on est convaincu d'avoir affaire à une Entamibe pathogène dont il est extrêmement important de bien connaître le cycle évolutif. L'observation du stade flagellé permettra dans beaucoup de cas d'éviter cette erreur regrettable.

(1) Les kystes d'*A. verrucosa* sont uninuclées comme ceux des *Nægléria*. On pourra se demander s'il n'est pas arbitraire de faire là une coupure générique. Qu'on se rappelle cependant l'*habitus* si différent de l'*A. verrucosa* et des Amibes du type *limax*, celle-là avec son périplaste si bien individualisé, véritable tunique plissée, ridée, celles-ci avec leur ectoplasme qui ne présente presque aucune condensation qui le délimiterait vis-à-vis du milieu ambiant. Le périplaste chez l'*A. verrucosa* est tellement bien différencié que pendant l'enkystement, comme j'ai pu le constater moi-même, l'enveloppe kystique se forme à l'intérieur du périplaste: on pourrait comparer ce processus à ce qui se passe dans la formation des spores chez les Bacilles endospores; dans les deux cas ce phénomène est déterminé par la présence d'un périplaste très bien individualisé. Voici ce que dit PENARD (1902) au sujet de l'enkystement d'une Amibe qu'il appelle *A. terricola* Ehrenberg, mais qui n'est probablement qu'une variété de l'*A. verrucosa*: « Quelques individus étaient réellement enkystés, c'est-à-dire que le plasma interne contracté s'y était entouré d'une membrane hyaline, lisse, à double contour (fig. 3); la pellicule membraneuse externe ne s'en voyait alors que mieux » (p. 107).

de tout petits centrioles (d'après les observations de HARTMANN et CHAGAS, 1910); ce serait donc une *mésomitose*; pour Dangeard (1910) il n'y aurait même pas de centrioles; ce serait alors une *panmitose*). Il me semble rationnel de créer pour les Amibes du groupe *limax* qui présentent ce mode de division nucléaire n'ayant rien de commun avec la promitose, le genre *Hartmannia* *nov. gen.* dédié à l'éminent protistologue Max HARTMANN (1).

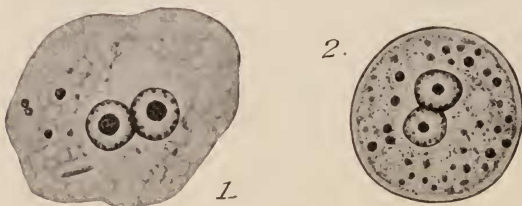


FIG. III. — 1 et 2, *Sappinia diploidea* (Hartmann et Nägler) $\times 2250$. — 1, individu libre montrant deux protocaryons adossés l'un à l'autre (les *Sappinia* sont des « *Diplozoaires* » de même que l'*Hartmannia binucleata* [Gruber]); l'accolement des deux noyaux détermine l'aspect d'une cloison de séparation qui serait épaissie (DANGEARD, NÄGLER), en réalité cette cloison n'a pas d'existence propre, c'est tout simplement l'expression optique de la rencontre de deux membranes nucléaires dont chacune est doublée en dedans d'une couche de chromatine périphérique; 2, kyste solitaire, avec deux protocaryons (qui se séparent ensuite) et les corps chromatoides relativement petits.

Voici quelles sont les diagnoses *différentielles* de ces trois genres établis dans l'ancien genre *Amœba* Ehrbg. (celui-ci continuera à s'appliquer aux Amibes de grosse taille du type de l'*A. verrucosa*; on sera du reste amené à encore scinder ce genre) (2) :

Nægleria nov. gen. (ce genre correspond plus spécialement aux Amibes dites du groupe *limax*). Division nucléaire caractérisée surtout par les corps polaires volumineux, constitués par le caryosome divisé, et par la plaque équatoriale peu développée, formée aux dépens de la chromatine périphérique.

(1) Chez certains Thécamœbiens (p. ex. *Arcella vulgaris*), la division nucléaire se passe suivant le mode promitotique; chez d'autres, tels que *Cochliopodium bilimbosum*, certains *Chlamydomyces* (*C. Schaudinnii* Schussler, 1911), on observe le mode de division nucléaire que j'ai proposé de désigner par le terme de *panmitose* (tout le matériel chromatique est employé à la formation de la plaque équatoriale). Les premiers peuvent être considérés comme dérivés des Amibes nues du type *Nægleria*, les seconds comme dérivés des Amibes du type *Hartmannia*.

(2) On a déjà séparé du genre *Amœba* la forme plurinucléée (genre *Pelomyxa* Greeff) et l'Amibe uninucléée mais possédant un *corps paranucléaire* très particulier qui joue le rôle du centrosome (genre *Paramœba* Schaudinn).

Hartmannia nov. gen. — Pas de corps polaires dans la division nucléaire. Tout (ou presque tout) le matériel chromatique est employé à la constitution de la plaque équatoriale (1).

Sappinia Dangeard. — Formes habituellement binucléées. Division nucléaire par une promitose sans stade de la plaque

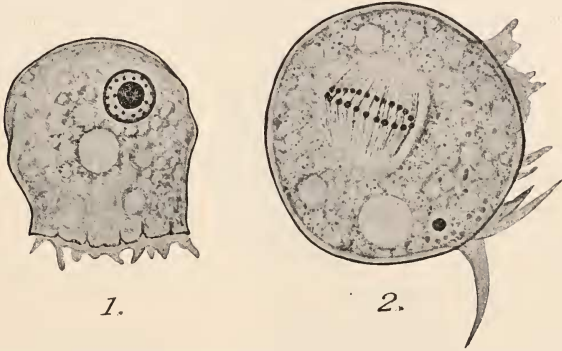


FIG. IV. — 1 et 2, *Cochliopodium bilimbosum* Auerbach. — 1, $\times 1000$, Amœbien à l'état végétatif montrant un protocaryon et sa coque mince et souple; 2, $\times 1500$, stade de la plaque (ou plus exactement de la *couronne*) équatoriale: la division nucléaire est ici une *panmitose* (toute la chromatine du noyau est employée à la constitution de la plaque équatoriale); remarquer l'absence de centrioles dans cette Amibe (« the large Amœba from liver-abscesses »); voici ce que dit l'auteur à ce sujet : « In conclusion, I should like to point out that at no stage in this division can I find any evidence for the existence of a centriol » (p. 281).

équatoriale nette (On pourra appeler *protomitose* cette variété simplifiée de la promitose, où la plaque équatoriale est très diffuse) (2). Exemples : *S. pedata* Dangeard, *S. (Amœba) diploidea* Hartmann et Nägler.

(1) C'est à ce genre qu'on devra rapporter la plus grosse des deux Amibes pathogènes (?) étudiées récemment par LISTON et MARTIN (1911). En effet, une plaque équatoriale très nette et un fuseau à striation longitudinale se constituent à la division sans qu'on observe des corps polaires ni même des centrioles aux deux pôles aigus du fuseau. MARTIN (1911) nie catégoriquement l'existence des centrioles dans cette Amibe (« the large Amœba from liver-abscesses »); voici ce que dit l'auteur à ce sujet : « In conclusion, I should like to point out that at no stage in this division can I find any evidence for the existence of a centriol » (p. 281).

(2) On distinguera facilement des *Sappinia* l'*Amœba binucleata* Gruber dont la division nucléaire, qui n'a rien à voir avec la promitose, a été bien étudiée par SCHAUDINN (1895). DOFLEIN (1911) place cette forme dans le genre *Pelomyxa*, ce qui est tout à fait artificiel. La mitose de l'*A. binucleata* rappelle très bien celle des *Hartmannia*, et cette forme portera le nom de *Hartmannia binucleata* (Gruber); elle ne paraît avoir aucune parenté avec *Pelomyxa palustris* Greeff.

III. — SUR LA STRUCTURE DU NOYAU ET LA MITOSE CHEZ LES ENTAMIBES DES VERTÉBRÉS; LA « QUESTION DU CENTRIOLE »

D'après HARTMANN et ses élèves la présence d'un centriole à l'intérieur du noyau serait un fait extrêmement général chez les Protistes, et ces auteurs ont établi toute une « théorie du centriole » (Voir en particulier, à ce sujet, NÄGLER, 1911). Je me

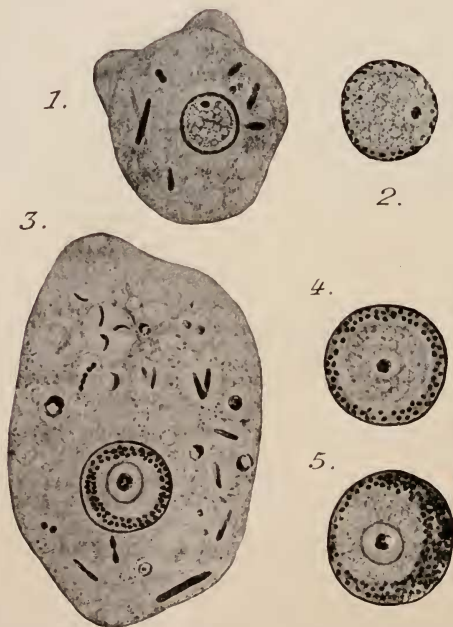


FIG. V. — 1 et 2, *Proctamæba muris* (Grassi). — 1, $\times 1500$, individu fixé au moment d'émission de pseudopodes; 2, $\times 2250$, noyau à structure caractéristique dont on retrouve les principaux traits chez toutes les Proctamibes : c'est un *paracaryon*, c'est-à-dire un noyau à grains de chromatine périphérique très nets et sidérophiles et à caryosome constitué par une trame lâche de plastine avec un (ou parfois plusieurs) pseudo-centriole (qui dans cette espèce est très excéntrique); 3 à 5, *Proctamæba salpæ* n. sp.; 3 $\times 1500$, une Amibe renfermant des bactéries dans des vacuoles digestives; 4 et 5, $\times 2250$, remarquer le pseudo-centriole relativement très volumineux et constitué par un certain nombre de grains; 5, le halo clair, que l'on voit autour du pseudocentriole, est bien délimité à l'extérieur par une sorte de membrane (on pourrait se demander si ce n'est pas là la limite extérieure du caryosome, la linine qui se trouve en dehors appartiendrait alors à la zone nucléaire extracaryosomienne, *Aussenkern* des auteurs allemands); la chromatine périphérique est très abondante.

réserve d'y revenir ultérieurement et je montrerai alors que la plupart des prémisses que les « centriolistes » font valoir en faveur de cette hypothèse ne résistent pas à une critique un peu serrée. Ici je ne parlerai que du noyau et de sa division chez les Entamibes. Je ferai cependant remarquer auparavant que les centriolistes auraient vu les centrioles à l'intérieur des corps polaires chez les Amibes *limax* (*Nægléria*), tandis que le centriole n'est généralement pas visible dans le noyau de ces Amibes à l'état de repos. Pour les Entamibes des Vertébrés, ce serait juste le contraire : si l'on observe facilement le « centriole » dans le caryosome des Entamibes à l'état végétatif, personne ne l'a bien mis en évidence aux deux pôles de la figure mitotique. Ni WENYON (1907) chez *Entamœba muris* (Grassi), ni DOBELL (1909) chez *E. ranarum* (Grassi) n'ont attribué une importance quelconque au grain caryosomien sidérophile qu'ils figurent cependant dans certains cas (ce grain fait souvent défaut chez *E. ranarum* des Grenouilles). J'ai suivi la division nucléaire dans *E. ranarum* (de Triton *tæniatus*) et je n'ai jamais observé de centrioles aux pôles du noyau en division; le grain caryosomien, considéré comme un centriole par les centriolistes, se confond plus ou moins complètement avec la partie achromatique du caryosome et se divise par étirement très irrégulièrement; les produits de sa division n'occupent point les pôles du noyau en division et même perdent toute individualité en se mélangeant à la plastine caryosomienne. Or, *c'est une pétition de principe que de prétendre qu'un corpuscule qui se comporte de la sorte pendant la division du noyau doit être assimilé au centriole*. Je considère pour le moment la question comme épuisée : *il n'y a pas de centriole dans le noyau des Entamibes des Vertébrés, pas plus que dans celui des Nægléria ou des Sappinia*.

Le noyau des Entamibes des Vertébrés diffère de celui des Amibes *limax* à protocaryon, par la chromatine périphérique plus abondante (1) et par un caryosome très appauvri quant à sa teneur en chromatine; ce caryosome est constitué par une trame assez lâche de plastine, dans laquelle on observe 1, 2, 3 et parfois (très rarement) un plus grand nombre de granules très sidérophiles, formés par un mélange de chromatine et de plastine (prétendus centrioles des auteurs allemands). *Cette*

(1) Les grains de la chromatine périphérique sont relativement volumineux chez les Entamibes et plus sidérophiles que dans les Amibes du type *limax*, ce qui tient probablement à ce qu'ils sont imprégnés avec de la plastine.

structure du noyau très caractéristique se retrouve, à des différences minimales près, chez toutes les *Entamoebes* des Vertébrés, ce qui permettra toujours de distinguer aisément celles-ci et les Amibes du groupe *limax* à protocaryon.

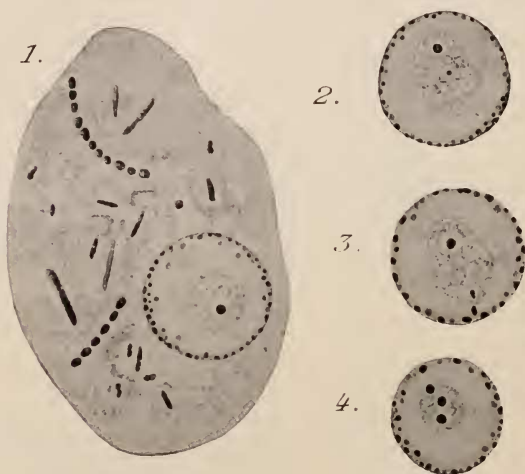


FIG. VI. — 1 à 4, *Proctamoeba ranarum* (Grassi). — 1, $\times 1500$, individu ayant ingéré des Bacilles et des chainettes de Bactéries; 2 à 4 $\times 2250$; 2 et 3, un petit grain sidérophile, provenant du pseudocentriole, chemine à travers la zone plastinnienne du caryosome pour se jeter (3) dans la zone de la chromatine périphérique : ce sont là les *variations cycliques* ou les *échanges caryo-caryosomiens*; 4, trois pseudocentrioles de taille égale et tous entourés d'un halo clair (le nombre de trois est tout à fait inexplicable si avec les « centriolistes » on considère ces grains caryosomiens comme autant de centrioles).

Les variations du volume du grain caryosomien sont surtout considérables chez une Amibe de *Box salpa*; dans cette Amibe le « grain caryosomien » (prétendu centriole) est représenté le plus souvent par un groupe de 2 à 4 granules sidérophiles (1).

(1) L'Amibe du *Box salpa* (qui a été signalée par LÉGER et DUBOSCQ en 1904) rappelle par l'importance de la zone renfermant des grains de chromatine périphérique et par les phénomènes cycliques caryo-caryosomiens très manifestes l'*Entamoeba testudinis* Hartmann, 1910. J'ai observé les kystes à 4 noyaux (et à corps chromatoides); je désignerai cette Amibe du *Box salpa*, au moins provisoirement, sous le nom de *Proctamoeba* (*Entamoeba*) *salpæ* n. sp. (pour le nom générique voir le chapitre suivant).

La division du noyau chez les Entamibes des Vertébrés s'effectue par un étirement de toutes ses parties constitutives, sans être accompagnée de remaniements importants. Et cependant, si l'on ne se guidait que par l'aspect extérieur de cette division nucléaire, on pourrait la prendre pour une mitose très perfectionnée : le noyau prend la forme d'un fuseau renflé vers le milieu et avec des pôles aigus; la partie achromatique, plasmienne du caryosome prend en s'étirant un aspect fibrillaire (fibres fusoriales), certaines de ces fibres s'imprègnent parfois

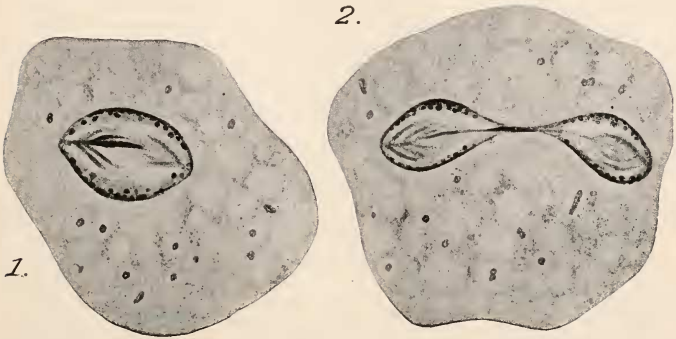


FIG. VII. — 1 et 2, *Proctamæba ranarum* (Grassi) $\times 1500$. — Mitose caractéristique pour le *paracaryon* des Proctamibes : figure achromatique astérienne bien développée; une sorte de centrosdrome; et néanmoins les grains de la chromatine périphérique se répartissent entre les deux noyaux fils (2) sans présenter de changements (comparer 1 et 2), — caractère d'une mitose très simple qui ne rappelle qu'*extérieurement* une mitose complexe; en d'autres mots, c'est une *mitose par étirement* (on peut se servir de cette expression qui paraîtrait illogique si nous ne savions pas toute la variété des modes de la *mitose dite primitive* des Protistes), ou, pour prendre un terme international, *paratinomitose* (*paramitose simple*).

[Ces figures, comme toutes les précédentes, ont été dessinées d'après les préparations fixées au sublimé alcoolico-acétique et colorées à l'hématoxyline ferrique-éosine].

de chromatine et simulent alors autant de centrosdromes. Les grains de la chromatine périphérique se répartissent entre les deux noyaux fils sans présenter de changements appréciables. Le même mode de la division nucléaire, très simple mais rappelant l'*aspect* d'une mitose complexe, s'observe chez les Opalines. Je propose de désigner sous le nom de *paramitose* cette division nucléaire; j'y distinguerai deux modalités : 1° *paramitose simple*

ou *paratinomitose* (1), division par *étirement* de toutes les parties du noyau avec changements dans sa structure réduits au minimum (2); cette division nucléaire s'observe chez les Entamibes des Vertébrés et chez quelques Opalines (p. ex. *Opalina saturnalis* Lég. et Dub.); 2° *paramitose complexe* ou *paramitose sensu stricto*, dans laquelle la disposition des diverses parties du noyau en division présente des différences notables avec celle du noyau à l'état de repos; ainsi il y a des *chromosomes*; la majorité des Opalines présentent la *paramitose complexe* (3).

IV. — SUR LA SYSTÉMATIQUE DES AMIBES PARASITES

Les Amibes parasites du tube digestif des Vertébrés constituent un groupe naturel et très homogène. Elles sont surtout caractérisées : 1° par la structure du noyau et son mode de division (*paratinomitose* = paramitose du type simple); 2° par les kystes à 4 ou 8 noyaux (4).

Les Entamides de petite taille qu'on a signalées chez quelques Invertébrés (*Amœba chironomi* Porter 1909, *Entamœba sp.* MacKinnon 1911), sont encore peu connues; elles paraissent différer considérablement des Amibes parasites des Vertébrés par leur noyau à gros caryosome compact (c'est un protocaryon analogue à celui des Amibes du type *limax*) et par plusieurs autres caractères. *Malpighiella refringens* Minchin, décrite par MINCHIN (1910) dans les tubes de Malpighi de *Ceratophyllus fasciatus*, présente un protocaryon et se nourrit par osmose au lieu d'englober les proies solides comme le font les Amibes des Vertébrés.

J'ai étudié une Amibe du vagin de la Sangsue médicinale; cette Amibe rappelle beaucoup *Malpighiella refringens*; j'ai pu

(1) Etymologie : *παρῑτείνω*, étirer (mitose par étirement); paramitose : *παρῑ*, à côté (division paraissant être voisine de la mitose complète).

(2) Ces changements sont cependant assez prononcés pour ne pas permettre l'assimilation de la paratinomitose à la division directe (amitotique).

(3) La *paramitose* représente un type de division nucléaire très bien individualisé. En effet, l'absence de corps polaires et de centrioles ne permettent de la placer ni dans la promitose ni dans la mésomitose; d'autre part, la chromatine périphérique ne se confond pas avec le caryosome pour former les chromosomes, donc ceux-ci ne sont pas constitués par la totalité de la chromatine nucléaire, par conséquent cette mitose ne peut pas être considérée comme une panmitose.

Une question intéressante qui se pose est celle de savoir s'il y a des Amibes parasites dans lesquelles la division nucléaire est une *paramitose complexe*. Il y aurait alors dans les Entamibes deux séries correspondant à celles, par exemple, qu'on observe chez les Opalines : une série où la division nucléaire est une *paratinomitose* et l'autre, plus évoluée, qui présente la *paramitose sensu stricto*.

(4) Les données sur les phénomènes sexuels (autogamie) qui précéderaient la formation de certains de ces kystes (kystes sporogoniques) sont trop contradictoires pour qu'on en puisse tenir compte actuellement.

constater que la division nucléaire chez cette Amibe de la Sangsue est toute différente de la paratinomitose des Amibes des Vertébrés. En effet, c'est une mitose qui paraît participer à la fois de la mésomitose et de la promitose. Le caryosome s'allonge et de ses deux pôles on voit surgir deux centrioles reliés entre eux par une centrodosome; le caryosome s'aplatit dans le plan normal à son premier allongement, c'est la mise au fuseau du caryosome qui formera une plaque équatoriale massive; aux deux pôles on observe quelques irradiations astériennes très peu développées. Ensuite la substance de la plaque équatoriale *glisse* (je pourrais dire *coule*) suivant la centrodosome et les irradiations astériennes vers les deux centrioles; donc, à la place de ces derniers, on observe des sphérules chromatiques de plus en plus volumineuses qui *simulent* à la fin deux corps polaires volumineux d'une promitose (1). Je désignerai sous le nom de *rhéomitose* (de *ῥέω*, couler) cette variété importante de la mésomitose (2).

Les kystes de la *Malpighiella* sp. des Sangsues s'observent très souvent; on les trouve en plus grand nombre que les individus non enkystés; les noyaux se divisent dans les kystes d'une façon synchrone et on a les kystes à 4 ou à 6 noyaux, avec des corps chromatoïdes ordinairement en forme de bâtonnets; dans les noyaux des kystes âgés le caryosome forme une calotte périphérique; il y a probablement un phénomène sexuel après une réduction (qui conduit au nombre de 6 noyaux).

Ainsi on voit que les représentants du genre *Malpighiella* Minchin diffèrent beaucoup des Entamibes des Vertébrés; l'éminent protistologue anglais a eu pleinement raison d'instituer ce nouveau genre.

D'autre part, *Entamæba blattæ* (Bütschli) s'éloigne notablement à la fois des Amibes des Vertébrés et d'autres Amibes intestinales des Invertébrés du type de l'*Amæba* (*Nægléria* ?) *chironomi* Porter. En effet l'*Entamæba blattæ* possède un noyau à membrane nucléaire très épaisse, la répartition des substances chromatique et achromatique y est assez particulière et complexe; si la division de ce noyau pendant la multiplication

(1) C'est l'absence de la plaque équatoriale à ce moment qui permettra de distinguer ce mode de division particulier de la promitose.

(2) Dans la rhéomitose il n'y a pas de chromosomes ni même dédoublement de la plaque équatoriale, tandis que dans la mésomitose (CHATTON) il y a des chromosomes ou au moins la plaque équatoriale se dédouble en deux plaques équatoriales filles qui effectuent leur mouvement ascensionnel vers les centrioles polaires.

schizogonique peut être considérée comme une paramitose *sensu stricto* avec chromosomes (6 d'après JANICKI [1909], 4 d'après MERCIER [1910]), elle apparaît par contre comme une mitose très complète au début du cycle gamogonique (centrioles, fibres achromatiques). Les kystes de cette Entamibe présentent un nombre de noyaux variable et en général élevé, ce qui constitue une différence importante avec les Amibes des Vertébrés; chez celles-ci, en effet, les noyaux dans les kystes sont en nombre constant qui généralement ne dépasse pas huit (parfois dix : *Entamæba Williamsi* Prowazek d'après PROWAZEK, 1911).

Nous avons ainsi au moins trois types différents d'Amibes parasites : l'Entamibe de la Blatte, les Amibes intestinales des Vertébrés, les *Malpighiella* des Invertébrés (1).

On s'accorde aujourd'hui à reconnaître que le genre *Entamæba* Leidy renferme des formes très disparates et constitue par conséquent un groupement artificiel qui n'a été maintenu que provisoirement. Les connaissances que nous possédons sur la structure du noyau, sa mitose et d'une façon générale sur l'évolution des Amibes parasites sont suffisantes pour subdiviser dorénavant ce genre en deux genres distincts : *Entamæba* Leidy qui restera le nom générique de l'espèce type parasite de la Blatte, *Proctamæba* *nov. gen.* pour les Amibes parasites du tube digestif (et de ses dépendances) des Vertébrés.

Voici quelles seront les diagnoses des genres *Entamæba*, *Proctamæba*, *Malpighiella* :

Entamæba Leidy. — Amibe de taille relativement grande. Le noyau, présentant la membrane nucléaire très épaisse, se divise tantôt (partie schizogonique du cycle évolutif) par une paramitose (2) (*sensu stricto*) avec 4 à 6 chromosomes, tantôt (partie gamogonique du cycle évolutif) par une mitose plus complexe. Kystes de dimensions variables et renfermant un nombre élevé et variable de noyaux. Nutrition animale.

(1) On ne pourra probablement pas rapporter au genre *Malpighiella* les Amibes du type *Amœba chironomi* Porter; ces dernières sont peut-être des parasites facultatifs; quoi qu'il en soit, elles semblent plutôt devoir rentrer dans le genre *Nægléria*, par la structure de leur noyau et par les kystes uninucléés; de plus, *A. (Nægléria) chironomi* présenterait une vacuole contractile.

(2) En se basant sur la présence de la paramitose chez l'*Entamæba blattæ* on peut concevoir les affinités entre cette forme et les Proctamibes des Vertébrés (chez lesquelles on observe aussi une division paramitotique, plus simple il est vrai) : l'Entamibe de la Blatte et les Proctamibes des Vertébrés peuvent avoir une origine monophylétique; une même forme originelle (Amibe du groupe *Umax*) a pu sous l'influence des conditions très différentes, réalisées d'un côté dans le tube digestif des Blattes, de l'autre dans celui des Vertébrés, aboutir à deux formes actuellement si dissemblables par la structure à l'état végétatif et surtout par l'évolution, que le sont les Proctamibes et l'Entamibe.

Proctamæba nov. gen. — Noyau à caryosome très pauvre en chromatine (1); la division nucléaire s'effectue suivant la paramitose simple (= paratinomitose). Kystes à 4 ou 8 noyaux. Nutrition animale.

Malpighiella Minchin. — Noyau avec un gros caryosome sidérophile et très peu de chromatine périphérique (*protocaryon*); division nucléaire très spéciale (rhéomitose) avec centrioles et plaque équatoriale massive formée par le caryosome. Kystes à 4 ou 6 noyaux. Alimentation par osmose.

*
**

CONCLUSIONS

En ce qui concerne la systématique des Amibes (libres et parasites), les conclusions de cette note préliminaire (2) sont les suivantes :

1° Le genre *Amæba* Ehrbg. renferme des formes disparates sans affinités directes; ce genre a grand besoin d'être démembré.

2° Les Amibes dites *limax* constituent un groupe naturel; toutefois, l'existence de deux modes de division nucléaire tout à fait différents amène à y distinguer deux genres dont l'un (*Nægleria* nov. gen.) montre pendant la division nucléaire des corps polaires volumineux, représentant la totalité (ou à peu près) du caryosome (*promitose*), tandis que l'autre genre (*Hartmannia* nov. gen.) ne présente pas de corps polaires à la division (*mésomitose* ou *panmitose*).

3° Les Amibes parasites des Vertébrés représentent un groupe très homogène et très naturel. Elles doivent être séparées de l'Entamibe de la Blatte dont la morphologie et surtout l'évolution diffèrent beaucoup de celles des Amibes des Vertébrés pour lesquelles on établira un genre nouveau (*Proctamæba* nov. gen.).

(1) On pourra appeler ce noyau à structure très caractéristique *paracaryon*, parce qu'à ce noyau correspond une mitose bien déterminée, *paramitose* simple.

(2) Mes recherches personnelles ont porté sur les Amœbiens suivants : *Nægleria limax* (Duj.), *N. punctata* (Dang.), *N. circumgranosa* (Alex.), *N. densa* (Alex.), beaucoup d'autres *Nægleria* indéterminées; *Sappinia diploidea* (Hartm. et Nägl.); *Amæba verrucosa* (Ehrbg.); *Chlamydomphrys (Enchelys) stercorea* (Cienk.); *Cochliopodium bilimbosum* (Auerb.); *Arcella vulgaris* (Ehrbg.); *Entlamæba blattæ* (Bütschli); *Proctamæba ranarum* (Grassi), *P. muris* (Grassi); *P. salpæ* n. sp.; *Malpighiella* sp. du vagin de *Hirudo medicinalis*. Les résultats descriptifs de ces observations, ainsi qu'un essai sur la systématique et la phylogénie des Thécamœbiens, seront exposés ailleurs.

4° Le genre *Malpighiella* Minchin est un genre très bien fondé; on distinguera facilement les représentants de ce genre, des Proctamibes d'une part et de l'Entamibe de la Blatte d'autre part.

J'ose espérer que les diagnoses que j'ai données dans le cours de cette note pour les genres *Nægléria*, *Hartmannia*, *Sappinia*, *Entamæba*, *Proctamæba*, *Malpighiella*, seront de quelque utilité, surtout pour les travailleurs qui, en se trouvant dans les pays exotiques ou pour toute autre cause, n'ont pas à leur disposition les nombreux mémoires consacrés à l'étude des Amibes, mémoires qui pour la plupart ont un caractère monographique. Si l'on a bien présents à l'esprit les caractères cytologiques précis de l'état végétatif, le stade flagellé des *Nægléria* et quelques autres caractères morphologiques sur lesquels j'ai insisté dans cette note, on ne fera plus cette regrettable confusion, qui a été commise maintes fois, entre les Amibes pathogènes et les Amibes, simples saprozoïtes.

A propos de la systématique des Rhizopodes, je ferai remarquer que l'étude cytologique constituera un auxiliaire précieux pour rénovier les données fournies par la morphologie extérieure et l'évolution telles qu'on les observe sans technique spéciale. Même c'est surtout la cytologie qui donnera les indications les plus précieuses sur les *liens phylogéniques* qui existent entre les diverses formes, et qui permettra par conséquent d'aboutir à une *classification* des Rhizopodes (et des Protozoaires en général) *la plus naturelle possible*.

Pour la systématique des Protistes il s'est fait une évolution comparable à celle qu'on a vue se produire ces dernières années pour la systématique des Champignons : les études cytologiques apportent les meilleurs caractères pour constituer une *classification continue*, basée sur la *théorie de l'évolution*; les classifications cytologiques ont supplanté toutes les autres. Ainsi, VUILLEMIN (1), dans un livre consacré à la systématique des Champignons, donne la place la plus importante aux CLASSIFICATIONS CYTOLOGIQUES, parmi les « classifications continues » (les classifications *discontinues* ne présentant du reste qu'un intérêt historique), et voici ce que dit l'auteur au sujet de ces classifications cytologiques : « La cytologie, ou science de la cellule, qui poursuit jusque dans les détails les plus intimes l'étude de la structure élémentaire, ne pouvait être négligée

(1) Les Champignons. Essai de Classification. Par le professeur Paul VUILLEMIN. (*Encyclopédie scientifique*. O. Doin et fils, Paris.)

des systématiciens, du moment que les caractères taxinomiques tirés des organes de la reproduction ou de la végétation, apparaissent comme le reflet de l'activité vitale » — *cellulaire* pourrait-on mieux dire. — « Approfondie par une pléiade d'habiles techniciens, cette science, jeune encore, a déjà fourni une riche moisson » (p. 227).

(Laboratoire d'anatomie comparée à la Sorbonne).

AUTEURS CITÉS

1911. ALEXEIEFF (A.). — Sur la division nucléaire et l'enkystement chez quelques Amibes du groupe *limax* (*C. R. Soc. Biol., Paris*, LXX, p. 455, 534, 588).
1912. ALEXEIEFF (A.). — Sur le stade flagellé dans l'évolution des Amibes *limax*. I. Stade flagellé chez *Amœba punctata* Dangeard (*C. R. Soc. Biol. Paris*, LXXII).
1910. CHATTON (E.). — Protozoaires parasites des branchies des Labres : *Amœba mucicola* Chatton, *Trichodina labrorum* n. sp. Appendice : Parasite des Trichodines (*Arch. Zool. exp.*, V, n° 5).
1910. DANGEARD (P.). — Etudes sur le développement et la structure des organismes inférieurs (*Le Botaniste*, XI).
1909. DOBELL (C.-C.). — Researches on the intestinal Protozoa of Frogs and Toads (*Quart. J. Micr. Sci.*, LIII, january).
1911. DOFLEIN (F.). — Lehrbuch der Protozoenkunde (Jena, G. Fischer).
1910. HARTMANN (M.). — Ueber eine neue Darmamœbe, *Entamœba testudinis* n. sp. (*Mem. Inst. Osw. Cruz*, II, fasc. 1).
1910. HARTMANN (M.) et C. CHAGAS. — Ueber die Kernteilung von *Amœba hyalina* Dang. (*Mem. Inst. Osw. Cruz*, II, fasc. 2).
1909. JANICKI (C. VON). — Ueber Kern und Kernteilung bei *Entamœba blattæ* Bütschli (*Biol. Centrbl.* XXIX, n° 12).
1911. LISTON (J.) et C.-H. MARTIN. — Contributions to the Study of Pathogenic Amœbæ from Bombay (*Quart. J. Micr. Sci.*, LVII, november).
1911. MACKINNON (D.-L.). — On some more Protozoan Parasites from *Trichoptera* (*Parasitology*, IV, n° 1).

1911. MARTIN (C.-H.). — A Note on the Early Stages of Nuclear Division of the large Amœba from Liver-abscesses (*Quart. J. Micr. Sci.*, LVII, november).
1910. MERCIER (L.). — Contribution à l'étude de l'Amibe de la Blatte (*Entamœba blattæ* Bütschli) (*Arch. Protistenk.*, XX).
1910. MINCHIN (E.-A.). — On some Parasites observed in the Rat-flea (*Ceratophyllus fasciatus*) (Festschrift zum sechzigsten Geburtst. R. Hertwigs, I).
1909. NÄGLER (K.). — Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amöben (*Arch. Protistenk.*, XV).
1911. NÄGLER (K.). — Studien über Protozoen aus einem Almtümpel. I. *Amœba hartmanni* n. sp. Anhang : Zur Centriolfrage (*Arch. Protistenk.*, XXII).
1902. PENARD (E.). — Faune rhizopodique du bassin du Léman (Genève).
1909. PORTER (A.). — *Amœba chironomi*, nov. sp., parasitic in the alimentary Tract of the larva of a *Chironomus* (*Parasitology*, II, n^{os} 1 et 2).
1911. PROWAZEK (S. VON). — Beiträge zur *Entamœba*-Frage (*Arch. Protistenk.*, XXII).
1895. SCHAUDINN (F.). — Ueber Teilung von *Amœba binucleata* Gruber (*S. B. Ges. Naturf. Berlin*).
1911. SCHUSSLER (H.). — *Chlamydothryx Schaudinni* n. sp. (*Arch. Protistenk.*, XXII).
1905. VAHLKAMPF (E.). — Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von *Amœba limax* einschliesslich der Züchtung auf künstlichen Nährboden (*Arch. Protistenk.*, V).
1910. WASIELEWSKI (T. VON) et L. HIRSCHFELD. — Untersuchungen über Kulturamöben (*Abhandl. Heidelberg. Ak.*, I).
1907. WENYON (C.-M.). — Observations on the Protozoa in the Intestine of Mice (*Arch. Protistenk.*, Suppl. I).
1911. WÜLKER (G.). — Die Technik der Amöbenzüchtung (*Centrbl. Bakter.*, L, n^{os} 19, 21).
-